Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer)

Der Einfluß von Amilorid und Mineralocorticoiden auf den Elektrolyttransport am Enddarm der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Konrad Veit
Wuppertal

1975

Aus dem Institut für Klinische Physiologie
im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer)

Der Einfluß von Amilorid und Mineralocorticoiden auf den Elektrolyttransport am Enddarm der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Konrad Veit
Wuppertal

Referent : Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Ulrich Hegel
Institut für Klinische Physiologie im
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin

Korreferent : Prof. Dr. med. Hans Herken

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Feien Universität Berlin

Promoviert am : 9.10.1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden experimentellen Untersuchungen wurden in den Jahren 1971 und 1972 im Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, zum Teil in Zusammenarbeit mit den Herren Dr. med. Sebastian Lange und Dr. med. Hans-Ulrich Gutsche, durchgeführt. Ihnen möchte ich an dieser Stelle für viele konstruktive Vorschläge und Diskussionsbeiträge danken. Frau Siglinde Lüderitz danke ich für die gewissenhafte Ausführung der Elektrolytanalysen.

Herrn Professor Hegel sage ich meinen besonders herzlichen Dank für die Überlassung des Themas, für die wertvollen Ratschläge sowie für die mir gewährte großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ein Teil der hier beschriebenen Methodik und der Ergebnisse ist mit Genehmigung des Promotionsausschusses der Medizinischen Fachbereiche vom 21.3.1972 bereits vorab veröffentlicht worden (26).

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0045

Inhaltsverzeichnis

			Seite
I.		Einleitung	1
II.		Methode	
	1.	Zur Messung der Potentialdifferenz	3
	2.	Zur Messung der Elektrolytnettotransporte	6
III.		Ergebnisse	
	1.	Potentialdifferenz	10
	2.	Wasser- und Elektrolyttransport bei Normaltieren	12
	3.	Wasser- und Elektrolyttransport bei adrenalektomierten Tieren	16
IV.		Diskussion	27
V.		Zusammenfassung	39
VI.		Literatur	41
		Curriculum vitae	

Der Einfluß von Amilorid und Mineralocorticoiden auf den Elektrolyttransport am Enddarm der Ratte

Einleitung

Das Acylguanidinderivat Amilorid gehört pharmakologisch zu den kaliumeinsparenden Diuretika (1). Wie Mikropunktionsuntersuchungen am distalen Nierentubulus zeigten (6,7) hemmt Amilorid dort sowohl die Natriumresorption als auch die Kaliumsekretion. Diese Wirkung ähnelt derjenigen des Spironolactons als Antialdosteron. An der Niere kann dieser Effekt jedoch nicht mit dem Mechanismus der kompetitiven Hemmung des Aldosterons, wie dies beim Spironolacton angenommen wird, erklärt werden, denn Amilorid beeinflußt auch beim adrenalektomierten Tier die renale Elektrolytausscheidung (1).

Am Kaltblüterepithel wirkt Amilorid ebenfalls hemmend auf den Natriumtransport ein. Bentley (2) kam bei Untersuchungen am Harnblasenepithel der Kröte zu dem Resultat, daß diese Substanz die luminale Natriumpermeabilität der Epithelzellen erniedrigt. Dieser Effekt ist sowohl an normalen Krötenblasen vorhanden als auch nach Stimulation des aktiven Transports durch Aldosteron. Die Wirkung von Aldosteron auf den aktiven Transport wird von Sharp und Leaf (21) über eine Vergrößerung der luminalen Zellmembranpermeabilität für Natrium erklärt. Dementsprechend würden also Amilorid und Aldosteron denselben Parameter, die luminale Natriumpermeabilität, entgegengesetzt beeinflussen. Allerdings sollte man aus den an diesem Kaltblüterepithel in vitro beobachteten Effekten keine Schlüsse

auf die generelle Wirkung am Säugetier in vivo ziehen, zumal Amilorid an der Niere außer dem Natrium- auch den Kaliumtransport modifiziert, der Transport des Kaliums an der Krötenblase aber vernachlässigbar gering ist.

Die Untersuchung der Amiloridwirkung an Warmblüterepithelien ist am Tubulusepithel der Niere besonders schwierig, weil hier alle Daten nur mit Hilfe der sehr aufwendigen Mikropunktionsmethoden gewonnen werden können. Deshalb lag es nahe, nach einem leichter zugänglichen Substrat zu suchen. Generell ist zu erwarten, daß Pharmaka, die den Elektrolyttransport beeinflussen, an allen aktiv transportierenden Epithelien des Organismus wirksam sind. Da dem Enddarm innerhalb des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes neben der Niere besondere Bedeutung zukommt, wurde die Dickdarmmucosa der Ratte als experimentelles Modell gewählt. In vielen Partialfunktionen ähnelt sie dem distalen Nierentubulus. Von Vogel et al. (24) wird sie als enterales Äquivalent zum distalen Tubulus aufgefaßt. Beiden Epithelien gemeinsam ist auch, daß der Ionentransport durch Mineralocorticoide reguliert wird. So fanden Edmonds und Marriott zum Beispiel, daß es unter Inaktinnarkose zu einem kontinuierlichen Anstieg der transepithelialen Potentialdifferenz am Colon der Ratte kommt (11). Diese Autoren machten durch Versuche mit adrenalektomierten und Aldosteron- substituierten Ratten wahrscheinlich, daß dieses Phänomen auf eine vermehrte Aldosteroninkretion der Nebennierenrinde unter der Narkose zurückzuführen sei, wodurch die die Potentialdifferenz erzeugende Natriumresorption am Colon stimuliert werde. Schließlich ist es von Vorteil, daß der transepitheliale Ionentransport am Colon nicht wie am proximalen Tubulus von einem gleichzeitig ablaufenden Transport organischer Substanzen über-

lagert und dadurch kompliziert wird (18).

Anlaß zu den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen waren die Fragen, ob Amilorid den transepithelialen Ionenfluß auch am Colon modifiziert, welche Beziehung die Aminoridwirkung dabei zur bereits bekannten Wirkung der Nebennierenrindenhormone hat, und ob der am Nierentubulus gefundene Effekt mit dem am Colon vergleichbar ist. Dazu haben wir sowohl die transepitheliale Potentialdifferenz als auch den transmucosalen Ionennettofluß an Normaltieren und an adrenalektomierten Tieren mit und ohne Pharmakoneinfluß gemessen.

Methode

1. Zur Messung der Potentialdifferenz (vgl. Abb. 1) :

Männliche Wistarratten (200-250 g) wurden mit 10 mg / 100 g K.G. Inaktin i.p. narkotisiert und auf einem auf Körpertemperatur* erwärmten Tisch gelagert. Zur Säuberung des distalen Colonabschnittes von Kotresten benutzten wir eine 10 ml- Spritze, auf deren Ansatzstück ein dünnes, flexibles, an den Enden zur Vermeidung von Darmwandverletzungen abgerundetes Plastikröhrchen aufgesetzt war. Dieses wurde vorsichtig wie bei einem Einlauf etwa 3 cm tief in den Anus der Ratte eingeführt und anschließend das Darmstück mit der auf 37^{o} C temperierten Spüllösung, die die gleiche Zusammensetzung wie die später zu instillierende Elektrolytlösung (s.u.) hatte, soweit aufgefüllt, daß die geformten Kotreste spontan abgingen. In das so gesäuberte Darmsegment wurde transanal ein 90^{o} gewinkelter

* 37^{o} C

Polyaethylen- Katheter mit einem Durchmesser von 7 mm durch Tabakbeutelnaht so eingebunden, daß das Darmlumen nach distal vollständig abgedichtet war, der Darm jedoch nicht durch Überdehnung irritiert wurde. Ein im waagerechten Schenkel des Katheters intraluminal verlaufendes doppelläufiges Röhrchen erlaubte durch den ersten Lauf die Auffüllung eines an seinem Ende befindlichen Ballons mit 2 ml Flüssigkeit und damit die Abdichtung des Lumens nach proximal und durch den zweiten Lauf, dessen innere Öffnung vor dem Ballon lag, die Füllung des etwa 4 cm langen Darmsegmentes. Auf diese Weise wurde von proximal nach distal langsam soviel Elektrolytlösung eingefüllt, bis die Instillatsäule 2 cm hoch im aufsteigenden Schenkel des Katheters stand.

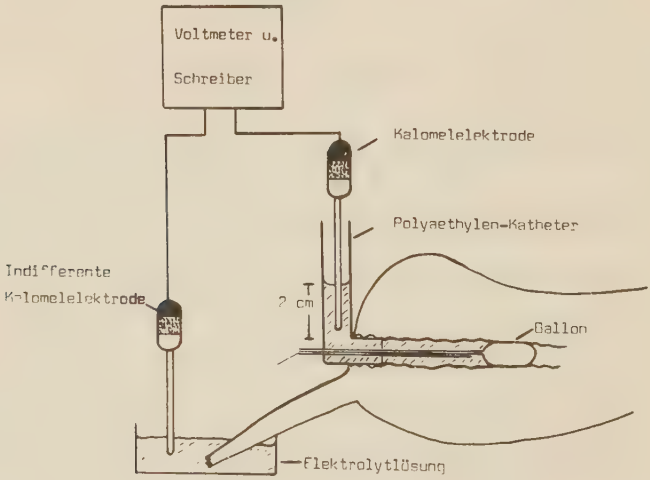


Abb. 1 Experimentelle Anordnung zur Registrierung der elektrischen Potentialdifferenz

* außen

Das Instillat hatte folgende Zusammensetzung (in mÄq / l) :

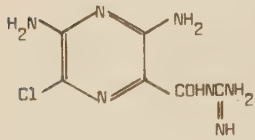
Na^+	K^+	Cl^-	HCO_3^-	mosmol/l
135	5	110	30	265

Es war damit nahezu plasmaisoosmolal und ähnelte der Ionenzusammensetzung im Plasma. Das Fehlen von Kolloiden im Vergleich zum Plasma mag zwar einen geringen osmotischen Gradienten zur Folge gehabt haben; doch sind die hier berichteten experimentellen Ergebnisse (s.u.), bei denen es mehr auf die Änderungen unter Amilorid und Aldosteron ankam als auf die Absolutwerte, sicher nicht auf das geringe osmotische Ungleichgewicht zwischen beiden Seiten des Epithels zurückzuführen.

Die intraluminal instillierte Elektrolytlösung hatte über eine Agarbrücke, bestehend aus mit 2% Agar aufgekochter Elektrolytlösung, Anschluß an eine Kalomelelektrode (vgl. Abb. 1). Als indifferente Elektrode wurde der coupierte Rattenschwanz benutzt, der in eine Elektrolytlösung eintauchte, die in der Ionenzusammensetzung der Ausgangslösung des Instillates entsprach. Der Anschluß des Voltmeters an diese Lösung erfolgte über eine gleichartige Kalomelelektrode mit Agarbrücke wie an das Darmlumen. Beide Elektroden wurden jeweils vor dem Versuch gegeneinander im selben Bad überprüft, so daß eine symmetrische Elektrodenanordnung gewährleistet war.

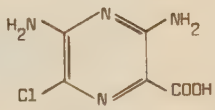
gravimetrisch, Natrium und Kalium flammenphotometrisch und Chlorid amperometrisch bestimmt.

Dem Instillat wurde in einer Versuchsreihe 1 mg Amilorid pro 1 ml Elektrolytlösung ($4 \cdot 10^{-3}$ M/l), in einer weiteren Versuchsreihe 1 mg 3,5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure pro 1 ml Elektrolytlösung ($5{,}3 \cdot 10^{-3}$ M/l) zugesetzt.



Amilorid

Guanidin



3,5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure

Die Amiloridlösungen waren in jedem Fall schwach milchig getrübt, so daß man annehmen konnte, daß trotz intensiver Bemühungen nicht alle Partikel vollständig gelöst waren.

Aus den Änderungen der Zusammensetzung der Ausgangslösung wurde der Nettotransport, bezogen auf eine Stunde und einen Zentimeter Darmlänge, von Volumen nach der Formel

$$\frac{\text{VOL.inst.} - \text{VOL.entn.}}{\text{1 Stunde} \cdot \text{Länge in cm}}$$

und von Elektrolyten nach der Formel

$$\frac{(\text{KONZ.inst.} \times \text{VOL.inst.}) - (\text{KONZ.entn.} \times \text{VOL.entn.})}{\text{1 Stunde} \cdot \text{Länge in cm}}$$

berechnet.

Um auszuschließen, daß die Ergebnisse durch Meßfehler infolge Flüssigkeitsverlustes verfälscht waren, haben wir in Vorversuchen geprüft, wieviel einer bestimmten Menge instillierter Flüssigkeit nach kurzer Verweildauer bei dem oben dargestellten Vorgehen der Darmentleerung wiedergewonnen werden konnte. Dazu wurden in ein Darmsegment von 5 cm Länge (nach dem Versuch durch Sektion bestimmt) jeweils fünfmal nacheinander 1ml, 0.8ml, 0.6ml, 0.4ml und 0.2ml instilliert und sogleich nach oben beschriebener Methode wieder entnommen. Die Flüssigkeitsproben konnten dabei mit einem Verlust von im Mittel nur (-2.4 ± 4.7) % der instillierten Menge wiedergewonnen werden. Auf diesen Fehler von -2.4 % wurden die Messungen nicht korrigiert. Da alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Messungen mit 1 ml Instillat ausgeführt wurden und die maximale Volumenresorption nicht höher als 0.6 ml war, kann mit Sicherheit gesagt werden, daß die Genauigkeit der Volumenbestimmung besser als ± 5 % war.

Die beidseitige Adrenalektomie wurde in der üblichen Technik durch stumpfe Trennung der Nebennieren vom Nierenpol ausgeführt und ihr funktioneller Erfolg am 7. postoperativen Tag mit einem Wasserbelastungstest nach Stolte et al. (23) überprüft. Postoperativ erhielten die Ratten 0,9 %ige NaCl-Lösung anstelle von Wasser, um Elektrolytverluste durch die Adrenalektomie auszugleichen. Es bestand freier Zugang zum Futter (Altromin Standard Diät). Zur Untersuchung des Einflusses von Nebennierenrindenhormonen auf den Elektrolyttransport wurden einige adrenalektomierte Ratten vor dem Versuch drei Tage lang mit je 1 µg/100g K.G.×Tag Aldosteron als Mineralocorticoid intraperitoneal substituiert. Den möglichen Einfluß von Glucocorticoiden prüften wir durch dreitägige Substitution von je 1 µg bzw. 50 µg Dexamethason/100g K.G.×Tag.

Die Unterschiede der Transportraten von Wasser und Ionen wurden mit dem t-Test nach Student auf Signifikanz geprüft.

Ergebnisse

1. Potentialdifferenz

In der Mehrzahl unserer Versuche, d.h. in ca. 80% der Fälle, stieg die transepitheliale Potentialdifferenz am Colon descendens von Normaltieren unter Inaktinnarkose über die Zeit kontinuierlich an. Dieser Effekt ist bereits von Edmonds und Marriott (10) beobachtet worden. Einen typischen Verlauf zeigt die ausgezogene Kurve in der folgenden Abbildung:

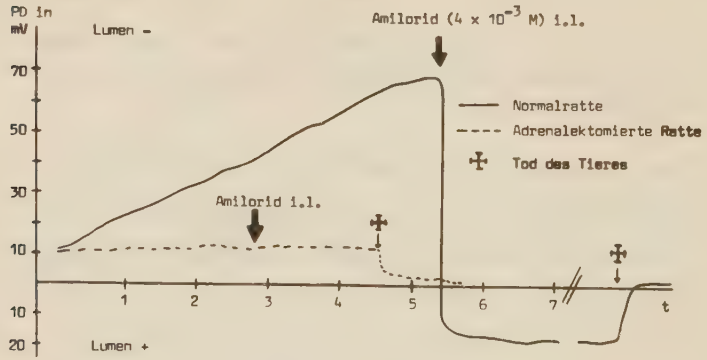


Abb. 3 Typische Verlaufskurve der transepithelialen Potentialdifferenz am Colon descendens einer Ratte (t in Stunden)

Die Anstiegsrate lag in unseren Versuchen im Mittel bei (15±5) mV/h (n=6), ausgewertet mit Anfang der 2. Stunde nach Narkosebeginn

über ca. 5 Stunden. Bei Versuchsdauern von 8 - 10 Stunden und darüber wurden maximale Werte bis zu -70 mV gemessen. Etwa 5 Stunden nach Inaktinnarkose war ein Plateau mit konstanter Potentialdifferenz erreicht. Bei adrenalektomierten Tieren hielt sich die Potentialdifferenz von Anfang an auf konstanten Werten um 10-15 mV. Wurde dem Instillat bei Kontrolltieren zum Zeitpunkt der maximalen transepithelialen Potentialdifferenz, also 5 - 6 Stunden nach Inaktinnarkose, Amilorid in einer Dosierung von $4 \cdot 10^{-3}$ M/l zugesetzt, so fiel die Potentialdifferenz innerhalb von wenigen Minuten ab und kehrte sich sogar um, so daß nunmehr das Lumen gegenüber dem Interstitium ein positives Potential besaß. Dieser Effekt wurde bei adrenalektomierten Tieren nicht beobachtet (gestrichelte Kurve in Abb. 3). Wurden die Tiere getötet, so näherte sich in allen Fällen das Potential der Null-Linie.

Die nun folgende Abbildung faßt die Ergebnisse der Versuche zur transepithelialen elektrischen Potentialdifferenz zusammen:

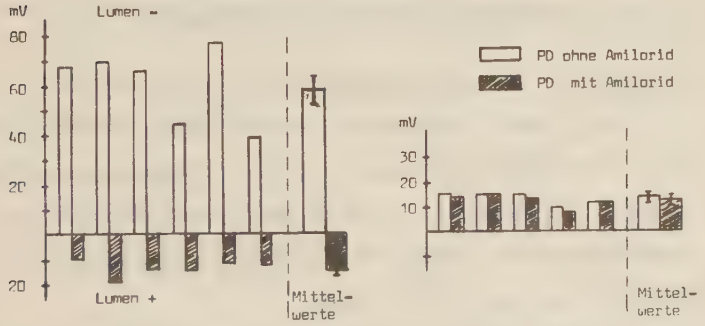


Abb. 4 Transepitheliale Potentialdifferenz an Normaltieren (links) und adrenalektomierten Tieren (rechts)

Die hellen Säulen zeigen die eine Viertelstunde vor Amiloridapplikation erreichten Potentiale in 6 Einzelversuchen bei Kontrolltieren bzw. in 5 Einzelversuchen bei adrenalektomierten Tieren. Die schraffierten Säulen sind die Werte, die 2 - 5 Minuten nach Amiloridzufuhr gemessen wurden. Die gemittelten Potentiale aller Versuche mit Standardabweichung sind jeweils davon abgesetzt. Während Amilorid bei Kontrolltieren eine Potentialänderung von (-58 ± 10) mV auf ($+15 \pm 5$) mV (Vorzeichen = Polarität des Lumens gegen das Interstitium) bewirkte, hatte es bei den adrenalektomierten Tieren keinen Effekt: Potentialdifferenz vor Amilorid (-14 ± 5) mV, nach Amilorid (-13 ± 5) mV.

Um diesen Effekt weiter abzuklären haben wir in einem zweiten Versuchsansatz die transepithelialen Ionennettoflüsse zunächst bei Normalratten gemessen.

2. Wasser- und Elektrolyttransport an Normaltieren

Die Ergebnisse der Resorptionsmessungen an Normaltieren sind in Tab. 1 und in Abb. 5 dargestellt. Die Daten zeigen, daß Normaltiere unter Kontrollbedingungen Wasser, Natrium und Chlorid resorbierten während Kalium sezerniert wurde. Die dadurch bedingte Änderung der Zusammensetzung der intraluminalen Elektrolytlösung während der Exposition ist aus Tab. 1a zu ersehen.
Wurde denselben Tieren in der 2. Stunde Elektrolytlösung unter Zusatz von Amilorid appliziert, so kam es zu einer deutlichen Sekretion von Volumen, Natrium und Chlorid, d.h. einer Umkehr der Transportrichtung gegenüber der 1. Stunde. Die Kaliumsekretion war

gegenüber Tieren ohne Amilorid erhöht. Wegen der gleichzeitig stattfindenden Wassersekretion kam es jedoch zu keiner signifikanten Änderung der Konzentration.

Tab. 1 Elektrolyt- und Volumentransport am Colon von Normaltieren
(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren ; neg. Vorzeichen ≙ Sekretion)

1a Konzentration in der Darmflüssigkeit in µÄq / ml nach 1 Stunde Exposition

	n	Na^+	K^+	Cl^-
1. Stunde (o. Amilorid)	13	130.30 ± 13.54	15.59 ± 9.58	89.06 ± 29.06
2. Stunde (m. Amilorid)	7	143.79 ± 6.10	14.23 ± 9.10	104.04 ± 9.74

1b Nettoresorptionsraten, bezogen auf 1 cm Darmlänge, in µÄq / h•cm bzw. ml / h•cm
(berechnet für dieselben Versuche wie in Tab. 1a nach Formel S.7 unter Berücksichtigung der jeweiligen Darmlängen)

	n	Na - Res.	K - Sekr.	Cl - Res.	Vol - Res.
1. Stunde (o. Amilorid)	13	13.53 ± 4.55	-0.47 ± 0.09	14.55 ± 4.66	0.09 ± 0.03
2. Stunde (m. Amilorid)	7	-4.36 ± 8.30	-1.31 ± 0.85	0.73 ± 8.05	-0.03 ± 0.09

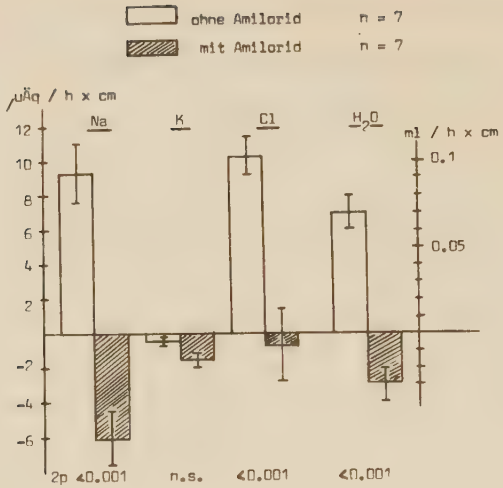


Abb. 5 Wasser- und Elektrolyttransport bei Normaltieren
1. Stunde ohne, 2. Stunde mit Amilorid (Daten der Tab. 1)
In dieser Abbildung, sowie in den Abbildungen 6-10 entsprechen die Abweichungen von den Mittelwerten nach oben und unten, angedeutet durch die senkrechten Striche, nicht wie in den folgenden Tabellen dem S.D.-Wert (Standard Deviation), sondern dem S.E.-Wert (Standard Error).

Wurde der Elektrolytlösung 3.5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure, ein auch an anderen Epithelien unwirksames chemisches Analog des Amilorid (2) - vgl. chemische Strukturformel auf Seite 8 - zugesetzt, so änderten sich die Resorptionsraten für Wasser, Natrium und Chlorid nicht (vgl. Tab. 2 und Abb. 6). Allerdings schien

die Kaliumsekretion zuzunehmen, jedoch war diese Zunahme in den vorliegenden Versuchen nicht signifikant.

Tab. 2 Elektrolyt- und Volumentransport am Colon von Normaltieren unter Zusatz von 3,5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure zum Instillat
(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren ; neg. Vorzeichen ≙ Sekretion)

2a Konzentration in der Darmflüssigkeit, µÄq / ml nach 1 Stunde Exposition

	n	Na^+	K^+	Cl^-
1. Stunde (o. Zusatz)	13	130.30 ± 13.54	15.59 ± 9.58	89.06 ± 29.06
2. Stunde (m. Zusatz)	7	134.57 ± 8.10	13.50 ± 4.27	83.47 ± 17.90

2b Nettoresorptionsraten, bezogen auf 1 cm Darmlänge, in µÄq / h•cm bzw. ml / h•cm
(berechnet für dieselben Versuche wie in Tab. 2a nach Formel S. 7 unter Berücksichtigung der jeweiligen Darmlängen)

	n	Na - Res.	K - Sekr.	Cl - Res.	Vol - Res.
1. Stunde (o. Zusatz)	13	13.53 ± 4.55	-0.47 ± 0.89	14.55 ± 4.66	0.09 ± 0.03
2. Stunde (m. Zusatz)	7	13.90 ± 6.80	-1.47 ± 1.10	14.30 ± 8.32	0.08 ± 0.04

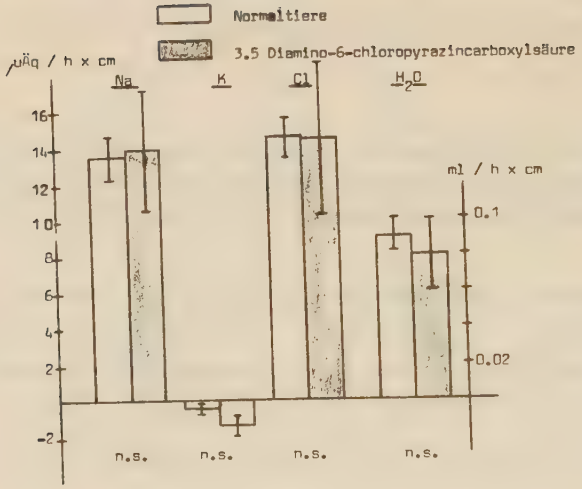


Abb. 6 Transportraten von Wasser und Elektrolyten am Colon unter Zusatz von 3.5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure (Daten der Tab. 2)

3. Wasser- und Elektrolyttransport bei adrenalektomierten Tieren

Das Colon descendens von adrenalektomierten Ratten wies gegenüber Normalratten deutlich reduzierte Transportraten auf (vgl. Tab. 3 und Abb. 7). Die Adrenalektomie führte zu einer Minderung der Absorptionsraten (Tab. 3b) für Wasser, Natrium und Chlorid. Ein Effekt auf den Kaliumtransport konnte nicht nachgewiesen werden. Dies ist auf eine verminderte Volumenresorption bei gleichzeitig verminderter Kaliumkonzentration zurückzuführen. Der Zusatz von Amilorid zum Instillat zeigte keine Wirkung auf den Elektrolyt-

transport. Anscheinend war die bei Kontrolltieren vorhandene Reaktionsfähigkeit durch die Adrenalektomie unterdrückt worden.

Tab. 3 Elektrolyt- und Volumentransport am Colon adrenalektomierter Ratten
(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren ; neg. Vorzeichen ≙ Sekretion)

3a Konzentration in der Darmflüssigkeit in µÄq / ml nach 1 Stunde Exposition

	n	Na^+	K^+	Cl^-
Normaltiere	13	130.30 ± 13.54	15.59 ± 9.58	89.06 ± 29.06
Adrenalektomierte Tiere	11	139.55 ± 2.27	8.12 ± 1.67	77.69 ± 24.49
Adrenalektomierte Tiere m. Amilorid	5	142.70 ± 2.66	8.54 ± 3.21	90.94 ± 32.13

3b Nettoresorptionsraten, bezogen auf 1 cm Darmlänge, in µÄq / h•cm bzw. ml / h•cm
(berechnet für dieselben Versuche wie in Tab. 3a nach Formel S. 7 unter Berücksichtigung der jeweiligen Darmlänge)

	n	Na - Res.	K - Sekr.	Cl - Res.	Vol - Res.
Normaltiere	13	13.53 ± 4.55	-0.47 ± 0.89	14.55 ± 4.66	0.09 ± 0.03
Adrenalektomierte Tiere	11	3.48 ± 2.58	-0.39 ± 0.45	7.62 ± 3.40	0.03 ± 0.02
Adrenalektomierte Tiere m. Amilorid	5	5.07 ± 5.49	-0.58 ± 0.82	9.46 ± 9.53	0.04 ± 0.04

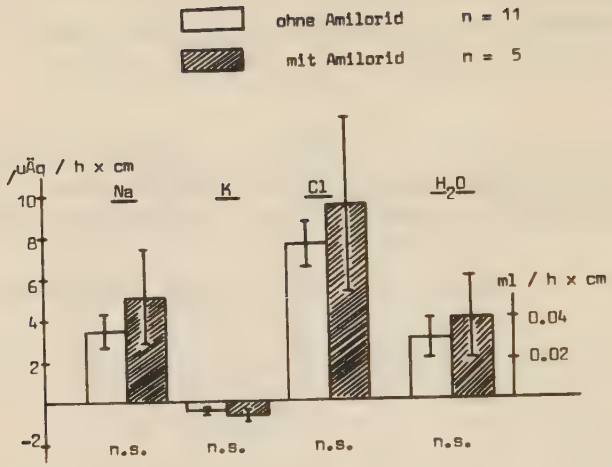


Abb. 7 Wasser- und Elektrolyttransport am Colon adrenalektomierter Ratten (Daten der Tab. 3)

n.s. : Unterschied zwischen ohne und mit Amilorid nicht signifikant (d.h. $2p > 0.05$)

Wurden die adrenalektomierten Ratten drei Tage lang mit Aldosteron in einer Dosierung von 1 µg / 100 g K.G. x Tag substituiert, so steigerten sich die Resorptionsraten am Colon, ohne allerdings die Werte der Kontrolltiere zu erreichen (vgl. Tab. 4 und Abb. 8). Auch die Reaktion der Darmmucosa auf Amilorid war bei diesen substituierten Tieren wiederhergestellt (vgl. Abb. 8 mit Abb. 5, S.14). Jedoch war sie gegenüber Normaltieren vermindert.

Tab. 4 Elektrolyt- und Volumentransport am Colon adrenalektomierter Tiere nach Aldosteron-Substitution, ohne und mit Amilorid
(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren ; neg. Vorzeichen ≙ Sekretion)

4a Konzentration in der Darmflüssigkeit in µÄq / ml nach 1 Stunde Exposition

	n	Na^+	K^+	Cl^-
Normaltiere	13	130.30 ± 13.54	15.59 ± 9.58	89.06 ± 29.06
Substituierte T. (o. Amilorid)	7	137.21 ± 4.28	11.22 ± 3.85	87.50 ± 5.58
Substituierte T. (m. Amilorid)	7	144.71 ± 8.04	11.51 ± 3.49	97.88 ± 18.41

4b Nettoresorptionsraten, bezogen auf 1 cm Darmlänge, in µÄq / h•cm bzw. ml / h•cm
(berechnet für dieselben Versuche wie in Tab. 4a nach Formel S. 7 unter Berücksichtigung der jeweiligen Darmlängen)

	n	Na - Res.	K - Sekr.	Cl - Res.	Vol - Res.
Normaltiere	13	13.53 ± 4.55	-0.47 ± 0.89	14.55 ± 4.66	0.09 ± 0.03
Substituierte T. (o. Amilorid)	7	9.29 ± 4.97	-0.49 ± 1.15	10.25 ± 3.05	0.07 ± 0.04
Substituierte T. (m. Amilorid)	7	-6.24 ± 4.24	-1.54 ± 0.85	-0.69 ± 5.82	-0.03 ± 0.03

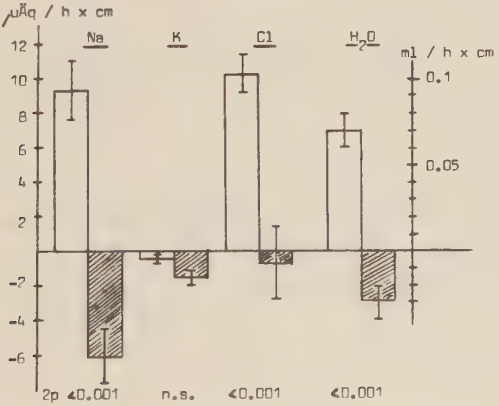


Abb. 8 Wasser- und Elektrolyttransport am Colon adrenalektomierter Ratten nach Aldosteron-Substitution (Daten der Tab. 4)

Adrenalektomierte Tiere, denen Glucocorticoide in der Form von Dexamethason in einer Dosierung von 1 µg bzw. 50 µg / 100 g K.G. ebenfalls drei Tage lang zugeführt wurde, zeigten ein ähnliches Verhalten wie nichtsubstituierte Tiere (vgl. Tab. 5 und Abb. 9) : Unabhängig von der Substitutionsdosis waren die Transportraten gegenüber den Kontrolltieren signifikant verringert, und die Reaktion des Darmepithels auf Amilorid fehlte.

Tab. 5 Elektrolyt- und Volumentransport am Colon adrenalektomierter Ratten nach Dexamethason-Substitution. Zum Vergleich dazu die Ergebnisse aus Tab. 3 nach Adrenalektomie ohne Substitution.
(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren ; neg. Vorzeichen ≙ Sekretion)

5a Konzentration in der Darmflüssigkeit in µÄq / ml nach 1 Stunde Exposition

	n	Na^+	K^+	Cl^-
Normaltiere	13	130.30 ± 13.54	15.59 ± 9.58	89.06 ± 20.06
Dexamethason-S. mit 1 µg/100g (o. Amilorid)	8	141.91 ± 2.50	7.20 ± 2.76	95.19 ± 4.59
Dexamethason 1 µg (m. Amilorid)	8	142.94 ± 1.45	7.78 ± 2.09	102.39 ± 5.97
Dexamethason-S. mit 50 µg/100g (o. Amilorid)	7	141.47 ± 5.16	6.34 ± 4.57	84.97 ± 7.75
Dexamethason 50 µg (m. Amilorid)	8	144.56 ± 3.30	6.42 ± 3.00	90.46 ± 7.11
Adrenalektomierte Tiere o. Amilorid	11	139.55 ± 2.27	8.12 ± 1.67	77.60 ± 24.49
Adrenalektomierte Tiere m. Amilorid	5	142.70 ± 2.66	8.54 ± 3.21	90.04 ± 32.13

5b Nettoresorptionsraten, bezogen auf 1 cm Darmlänge, in µÄq / h·cm bzw. ml / h·cm
(berechnet für dieselben Versuche wie in Tab. 5a nach Formel S.7 unter
Berücksichtigung der jeweiligen Darmlängen)

	n	Na - Res.	K - Sekr.	Cl - Res.	Vol - Res.
Normaltiere	13	13.53 ± 4.55	-0.47 ± 0.89	14.55 ± 4.66	0.09 ± 0.03
Dexamethason-S. mit 1 µg/100g (o. Amilorid)	8	1.72 ± 3.23	-0.53 ± 0.78	3.30 ± 2.32	-0.01 ± 0.02
Dexamethason 1 µg (m. Amilorid)	8	0.43 ± 4.68	-0.56 ± 0.61	3.13 ± 3.27	0.00 ± 0.03
Dexamethason-S. mit 50 µg/100g (o. Amilorid)	8	1.07 ± 1.77	-0.37 ± 1.19	5.93 ± 1.93	0.00 ± 0.02
Dexamethason 50 µg (m. Amilorid)	8	0.56 ± 1.77	-0.33 ± 0.87	5.94 ± 2.17	0.00 ± 0.01
Adrenalektomierte Tiere o. Amilorid	11	3.48 ± 2.58	-0.39 ± 0.45	7.62 ± 3.40	0.03 ± 0.02
Adrenalektomierte Tiere m. Amilorid	5	5.07 ± 5.49	-0.58 ± 0.82	9.40 ± 9.53	0.04 ± 0.04

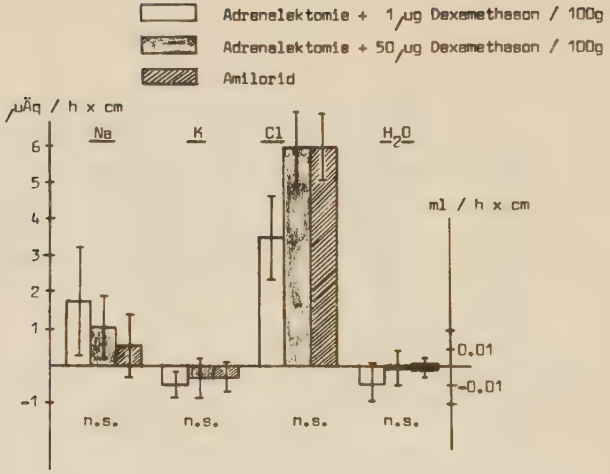


Abb. 9 Wasser- und Elektrolyttransport am Colon adrenalektomierter Tiere nach Dexamethason-Substitution (Daten der Tab. 5)

Da Amilorid stets in der 2. Stunde appliziert wurde mußte ausgeschlossen werden, daß eventuell entstehende unterschiedliche Transportraten allein durch den Zeitfaktor bedingt waren. Wie Tab. 6 und Abb. 10 zeigen bestand zwischen den Transportraten der ersten und der zweiten Stunde kein signifikanter Unterschied.

Tab. 6 Elektrolyt- und Volumentransport am Colon der Ratte
(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren ; neg. Vorzeichen ≙ Sekretion)

Ca Konzentration in der Darmflüssigkeit in µÄq / ml nach der 1. bzw. 2. Stunde

	n	Na^+	K^+	Cl^-	
Normaltiere					
1. Stunde	13	130.30 ± 13.54	10.59 ± 0.58	80.06 ± 23.06	
2. Stunde	7	125.20 ± 14.00	10.03 ± 12.91	83.12 ± 35.33	
Adrenalektomierte Tiere					
1. Stunde	11	130.55 ± 2.27	8.12 ± 1.67	77.09 ± 24.49	
2. Stunde	6	130.63 ± 2.07	8.09 ± 1.90	82.21 ± 6.39	

6b Nettoresorptionsraten, bezogen auf 1 cm Darmlänge, in µÄq / h·cm bzw. ml / h·cm
(berechnet für dieselben Versuche wie in Tab. 6a nach Formel S. 7 unter Berücksichtigung der jeweiligen Darmlängen)

	n	Na - Res.	K - Sekr.	Cl - Res.	Vol - Res.
Normaltiere					
1. Stunde	13	13.53 ± 4.55	-0.47 ± 0.09	14.55 ± 4.66	0.09 ± 0.03
2. Stunde	7	15.84 ± 5.17	-0.69 ± 0.07	15.99 ± 3.73	0.09 ± 0.03
Adrenalektomierte Tiere					
1. Stunde	11	3.40 ± 2.50	-0.39 ± 0.45	7.72 ± 3.40	0.02 ± 0.02
2. Stunde	6	3.72 ± 1.95	-0.53 ± 0.34	6.03 ± 1.72	0.03 ± 0.02

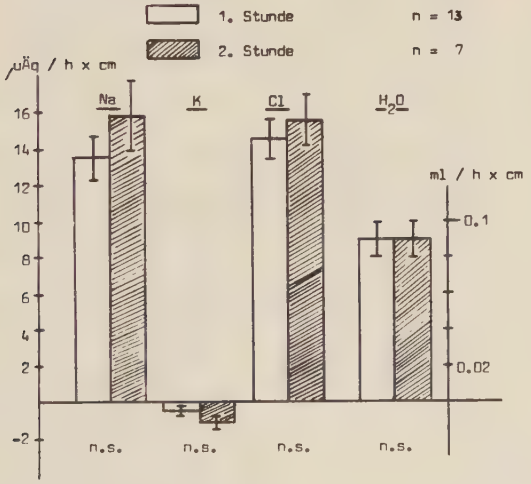


Abb. 10 Wasser- und Elektrolyttransport am Colon von Normalratten in der 1. und in der 2. Stunde (Daten der Tab. 6)
n.s. : Unterschiede zwischen 1. und 2. Stunde nicht signifikant (d.h. $2p > 0.05$)

Zum Zweck des einfacheren Vergleichs der Ergebnisse, die in den Tabellen 1-6 einzeln dargestellt sind, folgt eine Synopsis aller Daten in Tabelle 7, geordnet nach Konzentrationen im Instillat nach 1 Stunde Exposition (7a) und Transportraten des Epithels (7b).

Tab. 7 Synopsis der Tabellen 1-6

(Mittelwerte von je einer Messung an n Tieren; negatives Vorzeichen ≙ Sekretion ins Lumen)

7a Konzentration in der Darmflüssigkeit in µäq / ml

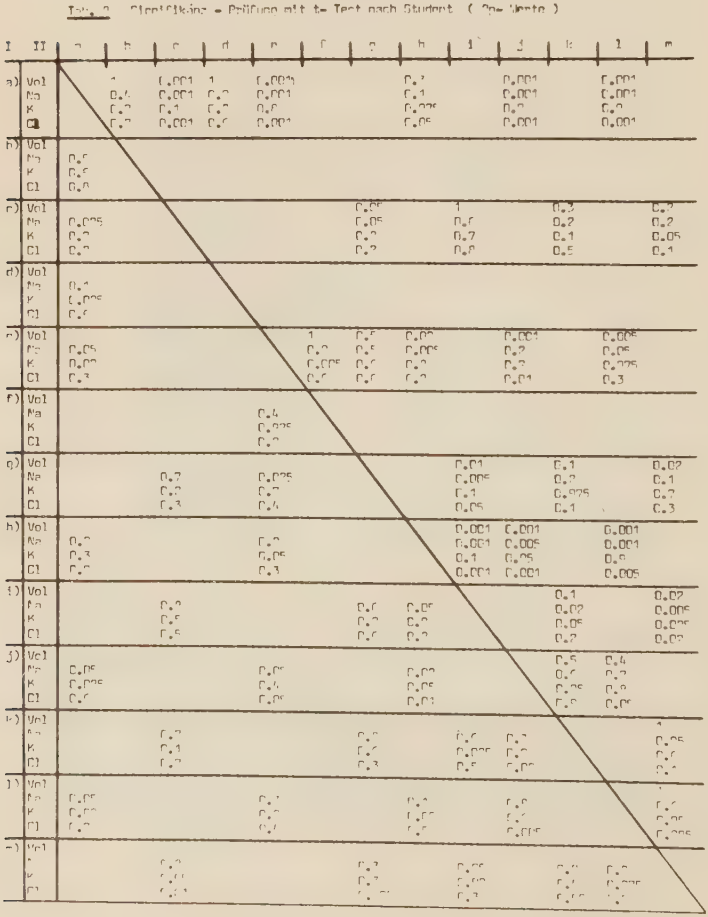
Versuchsbedingungen	n	Natrium - Konz.	Kalium - Konz.	Chlorid - Konz.
a) Normaltiere 1. Stunde	13	130.30 ± 13.54	15.50 ± 8.50	30.00 ± 20.00
b) " 2. "	?	125.20 ± 14.60	19.03 ± 12.61	82.10 ± 35.33
c) " m. Amilorid	?	143.00 ± 6.10	14.23 ± 9.10	104.04 ± 6.74
d) Normaltiere - 2,5 % Diäthylaminohydroxybenzoesäure	7	134.57 ± 8.10	13.50 ± 4.27	83.47 ± 17.05
e) Vorbehandelte Tiere 1. Stunde	11	137.55 ± 2.27	8.12 ± 1.67	77.60 ± 24.40
f) " " 2. "	6	130.63 ± 2.27	8.09 ± 1.90	82.71 ± 6.30
g) " " m. Amilorid	6	142.70 ± 2.06	8.54 ± 3.21	90.04 ± 30.13
h) " " m. Aldosteron	7	137.21 ± 4.28	11.22 ± 3.85	87.50 ± 5.50
i) Nebennierenexstirpierte Tiere m. Amilorid	7	144.71 ± 6.04	11.51 ± 3.49	97.00 ± 10.64
j) Nebennierenexstirpierte, m. 1 µg Dexamethason/100 g	6	141.91 ± 2.50	7.20 ± 2.76	95.19 ± 4.50
k) Dexamethason-substituierte T. mit Amilorid	8	142.94 ± 1.45	7.78 ± 2.09	102.39 ± 5.07
l) Nebennierenexstirpierte, m. 50 µg Dexamethason/100 g	8	141.47 ± 5.16	6.34 ± 4.57	84.97 ± 7.75
m) Substituierte Tiere (50 µg) mit Amilorid	6	144.56 ± 3.38	6.42 ± 3.08	90.46 ± 2.11

Zu Transportraten in ml bzw. µäq / h·cm

Versuchsbedingungen	n	Natrium	Kalium	Chlorid	Volumen
a) Normaltiere 1. Stunde	13	+13,53 ± 4,55	-0,47 ± 0,80	+14,55 ± 4,66	+0,09 ± 0,03
b) " 2. "	7	+15,84 ± 5,17	-0,65 ± 0,97	+15,55 ± 3,73	+0,08 ± 0,03
c) " m. Amilorid	7	- 4,36 ± 8,30	-1,31 ± 0,05	+ 0,73 ± 8,05	-0,03 ± 0,05
d) Normaltiere m. 3,5 Diamino-6-chloro-pyrazincarboxylsäure	7	+13,96 ± 6,80	-1,47 ± 1,10	+14,30 ± 8,32	+0,09 ± 0,04
e) Adrenalektomierte Tiere 1. Stunde	11	+ 3,48 ± 2,58	-0,39 ± 0,45	+ 7,62 ± 3,40	+0,03 ± 0,02
f) " " 2. "	6	+ 3,72 ± 1,05	-0,53 ± 0,34	+ 6,03 ± 1,72	+0,03 ± 0,02
g) " " m. Amilorid	5	+ 5,07 ± 5,49	-0,58 ± 0,82	+ 9,46 ± 9,53	+0,04 ± 0,04
h) " " m. Aldosteron	7	+ 9,29 ± 4,97	-0,49 ± 1,15	+10,25 ± 3,05	+0,07 ± 0,04
i) Aldosteron-substituierte Tiere m. Amilorid	7	- 6,24 ± 4,24	-1,54 ± 0,95	- 0,69 ± 5,92	-0,03 ± 0,03
j) Adrenalektomie, m. 1 µg Dexamethason/100 g	8	+ 1,72 ± 3,23	-0,53 ± 0,78	+ 3,30 ± 2,32	-0,01 ± 0,02
k) Dexamethason-substituierte T. mit Amilorid	8	+ 0,43 ± 4,68	-0,56 ± 0,61	+ 3,13 ± 3,27	0,00 ± 0,03
l) Adrenalektomie, m. 50 µg Dexamethason/100 g	8	+ 1,07 ± 1,77	-0,37 ± 1,19	+ 5,93 ± 1,93	0,00 ± 0,02
m) Substituierte Tiere (50 µg) mit Amilorid	8	+ 0,56 ± 1,77	-0,33 ± 0,87	+ 5,04 ± 2,17	0,00 ± 0,01

Alle gewonnenen experimentellen Daten wurden einer Signifikanzprüfung mit dem t-Test nach Student unterworfen. Die Ergebnisse dieser Prüfung sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen sind darin wie in Tabelle 7 mit den Buchstaben a-m gekennzeichnet. Geprüft wurden jeweils die Ergebnisse

derjenigen experimentellen Bedingungen gegeneinander, für die in der Matrix der Tabelle 8 im Kreuzungspunkt der entsprechenden Zeilen und Kolonnen ein 2p-Wert eingetragen ist. Als signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der beiden experimentellen Serien wird ein 2p-Wert ≤ 0.05 angesehen. Oberhalb der Diagonale stehen die Werte für den Vergleich von Transportraten, unterhalb die für Konzentrationen. Die wichtigsten Ergebnisse der Signifikanzprüfung sind auch in den Abbildungen 5-10 genannt.



Diskussion

Unter physiologischen Bedingungen werden im Dickdarm Natrium, Chlorid und Wasser resorbiert. Die in unserer Anordnung gefundenen Absolutwerte für diese Resorption stimmen gut mit den Befunden aus in vivo Experimenten von Edmonds und Marriott (11a) überein (vgl. Tab. 9), obwohl diese Autoren ein etwas unterschiedliches Verfahren benutzten: Im Gegensatz zur Instillationstechnik in unserer Arbeit, bei der die Flüssigkeit jeweils eine Stunde im Darmlumen verweilte, haben Edmonds und Marriott die Darmsegmente im geschlossenen Kreislauf perfundiert und die Volumenänderungen durch Bestimmung der Konzentrationsänderungen eines nichtresorbierbaren Markers (Phenolrot) bestimmt.

Tab. 9 Transportraten des Colon descendens von Normalratten nach Edmonds und Marriott (11a) und den vorliegenden Experimenten[1)]

	NaCl-Res. /uÄq/h·cm	K-Sekr. /uÄq/h·cm	Vol.-Res. ml/h·cm
Edmonds u. Marriott	16.4	---	0.066 [3)]
vorliegende Arbeit	ca.14 [2)]	0.5	0.09

1) Die Ausgangskonzentration der Perfusionslösung war bei Edmonds und Marriott (11a) 150 mMol NaCl, in der vorliegenden Arbeit 135 mMol NaCl.

2) Mittelwert aus in der vorliegenden Arbeit getrennt bestimmter Na- und Cl- Resorption

3) Berechnet aus der Differenz von NaCl-Resorption und K- bzw. HCO_3-Sekretion unter der Annahme isoosmotischer Resorption, die von Edmonds und Marriott nachgewiesen wurde.

Diese physiologisch beobachtete Resorption kann, wie bereits ebenfalls Edmonds und Marriott an adrenalektomierten Ratten nachgewiesen haben (11), durch Aldosteron beeinflußt werden. In unseren Versuchen haben wir qualitativ die gleichen Änderungen der Transporteigenschaften der Colonmucosa unter Adrenalektomie gefunden wie diese Autoren. Jedoch ist die quantitative Übereinstimmung unserer in Tabelle 3 und in Tabelle 4 aufgeführten Daten mit den entsprechenden von Edmonds und Marriott hier nicht so gut wie die bei den in Tabelle 9 gezeigte für Normalratten.

Für die Erklärung der den transepithelialen Natriumtransport steigernden Wirkung von Aldosteron gibt es im Prinzip vier Möglichkeiten (vgl. Abb. 11): Entweder wird der Mucosa-Serosa-Flux bei unverändertem Serosa-Mucosa-Flux erhöht (A), oder bei unverändertem M-S-Flux wird der S-M-Flux vermindert (B), oder sowohl M-S-Flux als auch S-M-Flux werden verändert, jedoch so, daß ein erhöhter M-S-Nettoflux resultiert. Dabei wäre hypothetisch sowohl denkbar, daß M-S-Flux und S-M-Flux gleichsinnig erhöht (C) als auch, daß sie gleichsinnig erniedrigt werden (D). Zur Zeit wird angenommen, daß Aldosteron nur den M-S-Flux stimuliert (Alternative A) (21). So spricht eine Reihe von Befunden dafür, daß Aldosteron die Synthese von Fermentproteinen induziert, durch deren Tätigkeit der Transport von Natrium beschleunigt wird. Einige Autoren (8,21) nehmen an, daß es sich dabei um eine "Permease" handelt, die die

passive Permeabilität der mucosalen Zellmembran für Natriumionen steigert, so daß diese vermehrt in die Zelle gelangen und dort durch Erhöhung des Substratangebotes den Natriumauswärtstransport beschleunigen.

Steigerung der

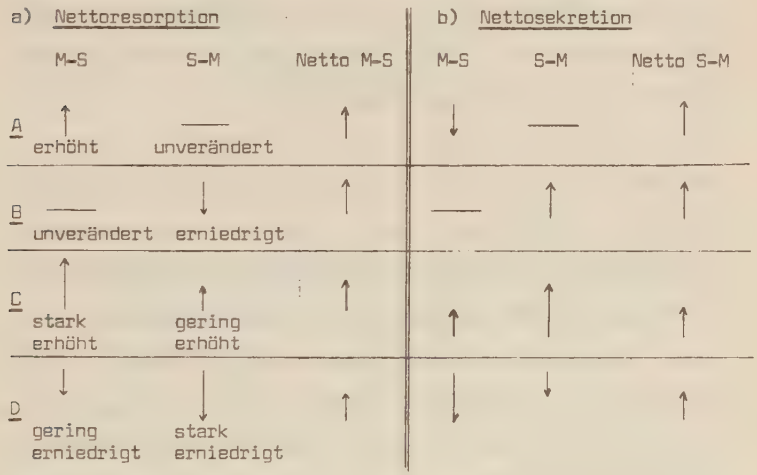


Abb. 11 Alternativen zur Erklärung einer Zunahme des Mucosa-Serosa-Nettofluxes (Resorption, a) bzw. des Serosa-Mucosa-Nettofluxes (Sekretion, b)

Entsprechend der Argumentation für eine Nettoresorption kann auch eine erhöhte Sekretion erklärt werden (vgl. Abb. 11b).

Am Warmblütercolon kann der Natriumtransport außer durch Aldosteron auch durch verschiedene Diuretika beeinflußt werden (19,20). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, daß das Diuretikum Amilorid den NaCl-Transport am Colon nicht nur hemmt sondern sogar umkehrt. Diese Änderung des Ionentransportes unter dem Einfluß von Amilorid kann nicht allein über eine Hemmung der Resorption erklärt werden. Die Tatsache der Umkehr des Elektrolytnettoflusses, also der Auslösung einer Enterosorption, legt vielmehr die Frage nahe, ob dabei eventuell eine Stimulation sekretorischer Transportmechanismen stattfindet.

Über den Wirkungsmechanismus von Amilorid existieren bisher keine eindeutigen Vorstellungen. Dies gilt sowohl für die Amphibienhäute, wo Amilorid den aktiven Natriumnettotransport von mucosal nach serosal entscheidend reduziert (2), als auch für die Säugetierniere, wo es außer der Natriumresorption aus dem Tubulus auch die Kaliumexkretion beeinflußt (1). Am Colon, wo Amilorid den blutwärts gerichteten Transport hemmt und den Elektrolytnettofluß umkehrt, müssen in Hypothesen über den Wirkungsmechanismus offenbar noch andere, für dieses Organ spezifische Phänomene einbezogen werden.

Ein Mechanismus, der auch die Umkehr des Nettotransportes erklären würde, könnte, entsprechend Abb. 11b, A, eine selektive Hemmung des Mucosa-Serosa-Fluxes sein. Dazu würde passen, daß an der Krötenblase die Amiloridwirkung in einer Erniedrigung der Natriumpermeabilität der mucosalen Membran gesehen wird (2,4,13). Den gleichen Effekt diskutieren Duarte und Giebisch für den distalen Nieren-

tubulus (7). Diese Hypothese ist auch mit dem am Colon gefundenen Effekt vereinbar, wenn sie durch das Zwei-Pumpen-Modell, das Sitte (22) für transportierende Epithelien angegeben hat, erweitert wird (vgl. folgende Abbildung).

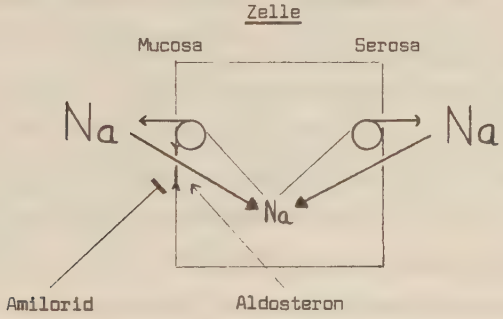


Abb. 12 Erklärung der Interferenz von Amilorid und Aldosteron mit Hilfe des Zwei-Pumpen-Modells für aktiven transepithelialen Natriumtransport : aktiv ⟶ : passiv

Nach diesem Modell strömt Natrium an der serosalen und mucosalen Membran passiv in die Zelle ein und ein an beiden Membranen vorhandenes Transportsystem eliminiert das Ion aktiv aus der Zelle. Im Falle des transepithelialen Transportes, also bei unsymmetrischen Zellen, unterscheiden sich beide Transportsysteme quantitativ in der Eliminationsrate: Je nachdem, ob die Eliminationsrate serosal oder mucosal größer ist, resultiert ein gerichteter transepithelialer Natriumnettofluß aus dem Darmlumen ins Interstitium (= Resorption) oder umgekehrt aus dem Interstitium ins Lumen (= Sekretion). Die Zelle wird also als ein Pump-Leck-System auf-

gefaßt, in dem die intrazelluläre Natrium-Konzentration sowohl durch eine Aktivierung der Pumpen als auch durch eine Änderung der Leckpermeabilität beeinflußt werden kann.
Nimmt man nun an, daß die mucosale Leckpermeabilität entsprechend der oben genannten Hypothese durch Amilorid erniedrigt wird, und unterstellt man, daß die Aktivität der Natriumpumpen vom intrazellulären Natriumangebot abhängt, so müßte unter Amiloridwirkung folgender Effekt auftreten: Wegen blockierten Einstroms von Natrium an der mucosalen Seite überwiegt hier der Auswärtstransport den Einstrom. Gleichzeitig sinkt die intrazelluläre Natrium-Konzentration ab. Dadurch werden beide Pumpen gehemmt, wodurch es an der serosalen Seite zu einem Überwiegen des Einstroms über den Auswärtstransport kommt. An der mucosalen Seite bleibt aber - wegen der völligen Blockierung des Einstroms - der Ausstrom immer noch größer als der Einstrom. Insgesamt muß so unter Amilorid ein Nettotransport von serosal nach mucosal resultieren. Das entspräche der in den Versuchen gefundenen Umkehr des transepithelialen Natriumflusses.

Die Abhängigkeit des Amilorideffektes von Aldosteron könnte man nach obigem Modell so verstehen, daß Amilorid die Aktivität einer Aldosteron-abhängigen Permease hemmt. Diese Hemmung könnte auf dem Wege geschehen, den auch schon Bentley an der Krötenblase angenommen hat, indem er eine Konkurrenz des Amilorid und der Permease um den Rezeptor der Permease an der mucosalen Seite diskutiert (2). Ebenso wie dort könnte die Guanidingruppe im Amiloridmolekül

verantwortlich für diesen Effekt sein, denn auch wir haben ja, wie Bentley, keine Reaktion durch die dem Amilorid chemisch analoge 3,5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure, der diese Gruppe fehlt (Formel vgl. Seite 8), festgestellt. Wenn man mit Sharp und Leaf (21) annimmt, daß bei Aldosteronmangel die Natriumpermeabilität der mucosalen Membran infolge fehlender Permease erniedrigt ist und diese durch Pharmaka nicht zusätzlich gesenkt werden kann, so muß eine Wirkung des Amilorid bei adrenalektomierten Tieren fehlen.

Denkbar, jedoch sehr hypothetisch, wäre auch folgende Vorstellung, die an das Vorhandensein zweier entgegengesetzt gerichteter Transportmechanismen anknüpft, die diesmal jedoch nur an einer Membran lokalisiert sind (vgl. folgende Abbildung).

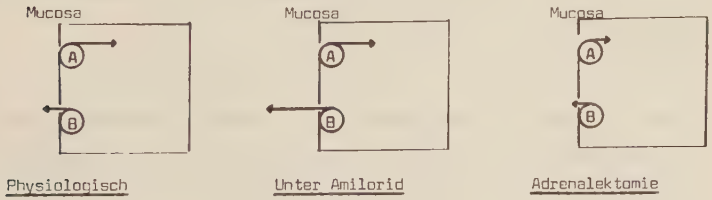


Abb. 13 Lokalisation zweier entgegengesetzt gerichteter Transportsysteme an der mucosalen Membran
(Erläuterung siehe Text)

Beide Transportsysteme oder Pumpen sind in ihrer Wirkung abhängig vom Aldosteron. Unter physiologischen Bedingungen dominiert Pumpe A über Pumpe B - es kommt zur Resorption von Natrium und damit von Wasser. Wird dem Instillat jedoch Amilorid zugesetzt, so erhält Pumpe B ein zusätzliches Stimulans und dominiert nun über Pumpe A, so daß es zu einer Sekretion kommt. Ist Aldosteron nicht vorhanden, so nach Adrenalektomie, verlieren beide Pumpen ihre Effizienz und es resultiert ein Zustand, der weder Resorption noch Sekretion zuläßt. Auch Amilorid wäre ohne Wirkung, wenn man annimmt, daß beide Pumpen Aldosteron zu ihrer Funktion prinzipiell benötigen. Dieses Modell enthält prinzipielle Schwierigkeiten, weil die Lokalisation der aktiven Pumpen bei den meisten Epithelien nicht in der apikalen (beim Darm mucosal) sondern überwiegend in der basalen (beim Darm serosal) und lateralen Zellmembran gefunden wird, und weil der Ausstrom von Natrium basal (=serosal) vermutlich nicht passiv stattfindet. Nähme man beide Pumpen in der serosalen Membran an, so wäre zu erklären, wie Amilorid dorthin gelangt. Dennoch hat dieses Modell im Hinblick auf die eventuelle Beteiligung der Drüsen in der Darmmucosa ein gewisses Interesse (vgl. unten).

Daß die in unseren Versuchen unter Amilorid auftretende Enterosorption an die Gegenwart von Aldosteron gebunden war, ist eine neue Erkenntnis hinsichtlich der Wirkung dieses Mineralocorticoids am Darmepithel: Aldosteron aktiviert neben der unter physiologischen Versuchsbedingungen beobachteten Natrium- und damit Wasserresorption auch diejenigen Prozesse, die der amiloridinduzierten Enterosorption zugrunde liegen. Es ist denkbar, daß der gleiche Mechanismus auch als Ursache für diejenige Sekretionssteigerung anzusehen ist, die

als unspezifische Reaktion auf die unterschiedlichsten chemischen, bakteriellen und pharmakologischen Reize auftritt (5,12). Denn auch unter dem Einfluß einiger Laxantien, wie zum Beispiel nach Bisacodyl, kommt es zu einem ins Lumen gerichteten Wasser- und Ionennettofluß (14), der qualitativ mit der amiloridinduzierten Enterosorption vergleichbar ist.

Es muß hier noch ein weiterer Aspekt erwähnt werden, der in der bisherigen Diskussion nicht berücksichtigt ist: Bei Entnahme der Probenflüssigkeit nach Amiloridzusatz fand sich stets etwas vermehrt Mucus im Darmlumen. Dies konnte man aus einer erhöhten Viskosität der Probenflüssigkeit schließen. Da besonders im Colon descendens reichlich sezernierende Zellen vorhanden sind, könnte Amilorid auch über eine Stimulation dieser Zellen wirken. Die Stimulierbarkeit der Drüsenzellen müßte dann unter Aldosteronmangel ausfallen. Wie weit die Mucussekretion an der unter Amilorid beobachteten Enterosorption quantitativ beteiligt ist, konnte in den hier berichteten Experimenten nicht geprüft werden.

Es bleibt noch zu diskutieren, inwiefern die beobachteten Transportveränderungen durch die unterschiedlichen transepithelialen Potentialdifferenzen beeinflußt sein können. Zunächst soll gezeigt werden, daß die von uns beobachteten Potentialdifferenzen von bis zu -70 mV bei Normaltieren (Lumen negativ gegen Interstitium) keine Diffusionspotentiale sein können. Denn selbst die extreme Annahme einer Natrium-selektiven Membran würde für ein Diffusionspotential dieser Höhe ein Natrium-Konzentrationsverhältnis von ca.13 erfordern. Dies läßt sich unter Anwendung der Nernst'schen Gleichung

zeigen:

$$E^{diff}_{Na} = E_l - E_i = \frac{-R \cdot T}{Z \cdot F} \cdot 2{,}3 \log \frac{Na_l}{Na_i} = -62\ mV \log \frac{Na_l}{Na_i} = -70\ mV$$

$$\frac{-70}{-62} = 1{,}13 = \log \frac{Na_l}{Na_i}$$

$$10^{1{,}13} = \frac{Na_l}{Na_i} = 13$$

d.h. $Na_l = 13\ Na_i$. (l = Lumen ; i = Interstitium)

Die Natrium-Konzentrationen im Lumen müßten also nach einigen Stunden Versuchsdauer ca. einen Faktor 13 größer als im Interstitium gewesen sein. Tatsächlich betrug das Konzentrationsverhältnis für Natrium zum Zeitpunkt der maximalen transepithelialen Potentialdifferenz

$$\frac{\text{Lumen}}{\text{Plasma}} = \frac{125\ mÄq\ /\ l}{145\ mÄq\ /\ l} = 0{,}8 \quad .$$

(Der angegebene Plasmawert wurde in dieser Arbeit nicht gemessen, sondern aus anderen Serien an vergleichbaren Tieren übernommen.)

Das bedeutet, daß der Gradient für die Natrium-Diffusion nicht nur viel kleiner, sondern auch umgekehrt orientiert war. Es kann sich also bei den zum Teil beträchtlichen transepithelialen Potentialdifferenzen nur um einen elektrogenen Anteil des aktiven Transportes handeln. Gleichzeitig ist damit bewiesen, daß nicht die Potentialdifferenz die beobachteten Flüsse treibt, da die Polung falsch

ist: "Lumen negativ gegen Interstitium" würde die Natriumresorption hemmen. Der Zusammenbruch des Potentials und die Umpolung, die unter Amilorid zu beobachten war, hätte die Natriumresorption also eher gefördert. Wir fanden aber in unseren Versuchen unter Amiloridanwendung bei Tieren in Gegenwart von Aldosteron stets eine erhöhte Natriummenge im Darmlumen. Also kann die Änderung der Potentialdifferenz unter Amilorid auch dessen Effekt auf den Transport nicht erklären. Edmonds fand bei Enteropathien mit erhöhter Mucussekretion eine Umkehr der Potentialdifferenz (12). Diese Umkehr zeigt eine erstaunliche Ähnlichkeit mit der in unseren Versuchen nach Amiloridzufuhr beobachteten.

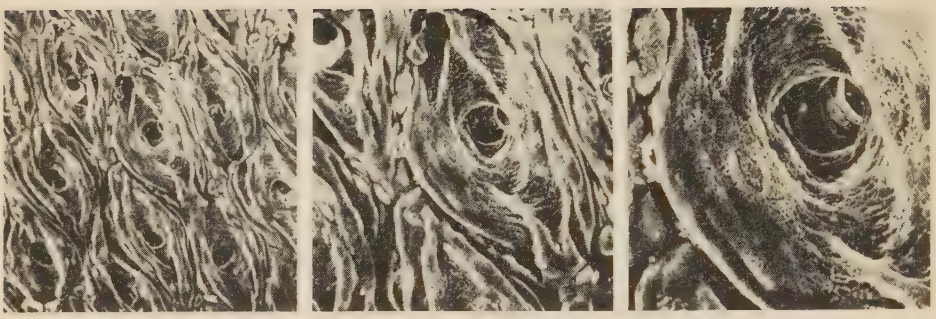
Alle in den hier berichteten Experimenten verwendeten Instillationslösungen waren kolloidfrei. Somit war der kolloidosmotische Druck niedriger als im Plasma und die Sekretion erfolgte entgegen einem onkotischen Gefälle. Da dennoch die Enterosorption unter Amilorid sowohl gegen einen elektrischen als auch gegen einen onkotischen Gradienten erfolgte, kann es sich auch bei dem Transport nur um einen aktiven Prozeß handeln. Der Verlust der Amiloridwirkung nach Adrenalektomie wäre in diesem Zusammenhang mit Edelman (8) so zu erklären, daß die für einen aktiven Transport nötige Energie, von der man annimmt, daß sie aus einer aldosteroninduzierten Beschleunigung des Stoffwechsels gezogen wird, bei Aldosteronmangel nicht zur Verfügung steht.

Das Colon adrenalektomierter Ratten absorbierte deutlich weniger Natrium und Wasser und es baute einen niedrigeren transepithelialen Kaliumgradienten auf als das von Ratten mit intakten Nebennieren.

Augenscheinlich steht damit der Elektrolyt- und Wassertransfer am Colon descendens der Ratte unter dem regulativen Einfluß der Nebennieren (11,16). Die Funktionsstörungen des Dickdarms nach Adrenalektomie ließen sich durch die Substitution von Aldosteron in physiologischen Dosen (3) fast vollständig normalisieren und auch Amilorid wurde wieder wirksam. Durch Dexamethason waren die Störungen auch in verhältnismäßig hoher Dosierung nicht zu beeinflussen. Diese Befunde ähneln denen von Mikropunktionsuntersuchungen am distalen Nierentubulus: Auch dort stimulieren Mineralocorticoide die Natriumresorption und die Kaliumsekretion, während ein wesentlicher Effekt von Glucocorticoiden auf den Ionentransport nicht nachweisbar ist (23). Im Gegensatz zu der in einigen Teilaspekten vergleichbaren Wirkung der Nebennierenrindenhormone auf den Nierentubulus und das Colonepithel zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Reaktion beider Epithelien auf Amilorid. Am distalen Tubulus hemmt das Pharmakon vorwiegend die Kaliumsekretion und zu einem geringen Maße wird unter seinem Einfluß auch die Natriumresorption vermindert (7). Die renale Wirkung ist von Nebennierenrindenhormonen weitgehend unabhängig (1). Demgegenüber konnten wir am Colonepithel keine bevorzugte Wirkung auf den Kaliumtransport finden. Die Natriumresorption wurde wie am distalen Tubulus gehemmt und es kam darüberhinaus zu einer Enterosorption von Natrium und Wasser. Dieser Vorgang benötigte die Gegenwart von Aldosteron, wobei die vorliegenden Ergebnisse nicht entscheiden lassen, ob Aldosteron über eine Steigerung der passiven Permeabilität oder über eine Aktivierung des sekretorischen Transportsystems den lumenwärts gerichteten Nettostrom von Ionen und Wasser ermöglicht. Zwar sind die an Niere und Colon gefundenen Ergebnisse vergleichbar, jedoch

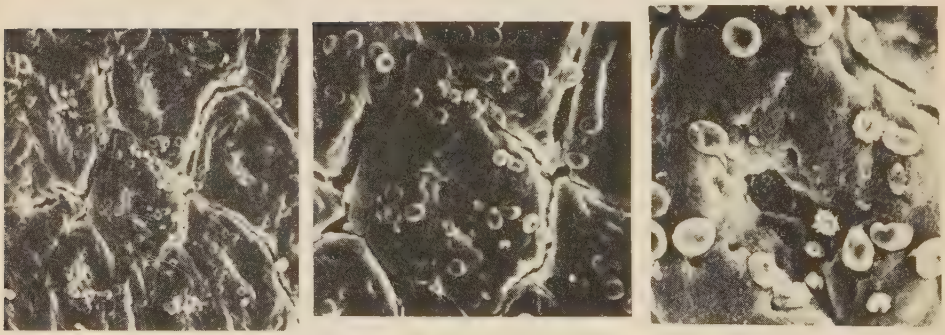
sind offenbar die Wirkungsmechanismen an beiden Organen verschieden.

Ob man den Wirkungsmechanismus von Amilorid allein aus dessen biochemischen Wechselwirkungen mit einzelnen Schritten der aktiven und passiven Transportsysteme wird erklären können, muß nach vorläufigen morphologischen Untersuchungen offen bleiben. Abb. 14 und Abb. 15 zeigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche der Colonmucosa von Präparaten, die nur mit physiologischen Lösungen (Abb. 14 a-c) bzw. mit Lösungen mit Zusatz von Amilorid (Abb. 15 a-c) in Kontakt waren. Bei oberflächlicher Betrachtung fällt zumindest ein deutlicher Unterschied der Oberflächenstruktur ins Auge, dessen genauere Bedeutung in weiteren Untersuchungen geklärt werden muß.



a b c

Abb. 14 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche der Colonmucosa nach einstündiger Exposition von physiologischer Elektrolytlösung



a b c

Abb. 15 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche der Colonmucosa nach einstündiger Exposition von Elektrolytlösung mit Zusatz von Amilorid ($4 \cdot 10^{-3}$ M/l)

Vergrößerung: a) 500-fach b) 1000-fach c) 2000-fach

Zusammenfassung

1) Ratten wird in Inaktinnarkose in die funktionell isolierten letzten 4-6 cm des Enddarms ein abgemessenes Flüssigkeitsvolumen bekannter Zusammensetzung instilliert. Nach einstündiger Exposition wird die gesamte Flüssigkeit wieder entnommen und die Veränderung des Volumens und des Natrium-, Kalium- und Chloridgehaltes bestimmt. In einer unabhängigen Versuchsreihe wird die transepitheliale Potentialdifferenz über mehrere Stunden registriert.

2) Instillation von annähernd plasmaisoosmolaler Elektrolytlösung führt bei normalen Tieren zu folgenden Ergebnissen:

a) Anstieg der transepithelialen elektrischen Potentialdifferenz auf maximale Werte um -70 mV

b) Resorption von Volumen 0.09 $\pm$ 0.03 ml / h•cm
Natrium 13.53 $\pm$ 4.55 µÄq / h•cm
Chlorid 14.55 $\pm$ 4.66 µÄq / h•cm

c) Sekretion von Kalium 0.47 $\pm$ 0.89 µÄq / h•cm

3) Bei adrenalektomierten Tieren liegen die Transportraten signifikant niedriger:

a) Kein Anstieg der transepithelialen Potentialdifferenz mit der Zeit

b) Resorption von Volumen 0.03 $\pm$ 0.02 ml / h•cm
Natrium 3.48 $\pm$ 2.58 µÄq / h•cm
Chlorid 7.62 $\pm$ 3.40 µÄq / h•cm

c) Die Sekretion von Kalium ist mit 0.34 $\pm$ 0.45 µÄq / h•cm nicht signifikant verschieden von normalen Tieren.

4) Nach Zusatz von Amilorid zum Instillat kommt es bei normalen Tieren zu einer Umkehr der Transportrichtung, d.h. es wird in allen Fällen sezerniert. Die transepitheliale Potentialdifferenz fällt nach intraluminaler Zufuhr von Amilorid augenblicklich ab.
Bei adrenalektomierten Tieren ändert der Zusatz von Amilorid weder die transepitheliale Potentialdifferenz noch die Transportraten signifikant im Vergleich zu adrenalektomierten Tieren ohne Amilorid, d.h. Amilorid bleibt hier ohne Wirkung.

5) Dreitägige Aldosteron-Substitution von 1 µg / 100g K.G. führt im Vergleich zu nicht substituierten adrenalektomierten Tieren zu einer signifikant erhöhten Resorption von Volumen, Natrium und Chlorid, ohne allerdings die Werte von normalen Tieren zu erreichen. Amilorid hat die gleiche Wirkung wie bei normalen Ratten, d.h. es kommt in jedem Fall zur Sekretion von Volumen, Natrium, Kalium und Chlorid.

6) Dreitägige Dexamethason-Substitution von 1 µg und von 50 µg pro 100g K.G. bei adrenalektomierten Ratten zeigt keinen Einfluß auf die Transportraten. Sie sind gegenüber normalen Kontrolltieren signifikant niedriger, und die Wirkung von Amilorid bleibt aus.

7) Der Zusatz des pharmakologisch inaktiven Amilorid-Analogen 3,5 Diamino-6-chloropyrazincarboxylsäure zur Elektrolytlösung hat keinen signifikanten Einfluß auf die Resorptions- bzw. Sekretionsraten bei normalen Tieren.

8) Die Befunde hinsichtlich der transepithelialen elektrischen

Potentialdifferenz sowie der Resorption bzw. Sekretion sind mit früheren Befunden von Edmonds vereinbar. Erstmals wird der Einfluß von Amilorid auf den Elektrolyttransport am Enddarm der Ratte beschrieben und nachgewiesen, daß die Amiloridwirkung von der Gegenwart von Aldosteron abhängt.

Literatur

1. BAER, J.E. : Pharmacology of anticaluretic substances. Symposium Feldafing 1968, S. 247
2. BENTLEY, P.J. : Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. J. Physiol. 195, 317 (1968)
3. CADE, R., T. PERENICH : Secretion of aldosterone by rats. Amer. J. Physiol. 208, 1026 (1965)
4. CRABBE, J., E.N. EHRLICH : Amiloride and the mode of action of aldosterone on sodium transport across toad bladder and skin. Pflügers Archiv 304, 284 (1968)
5. DAVENPORT, H.W. : Physiology of the digestive tract. Chicago Year Book Medical Publishers Inc. 1961
6. DEETJEN, P. : The localization of transport processes in the nephron and their inhibition by diuretic agents as analyzed by micropuncture techniques. Symposium Feldafing 1968, S. 215
7. DUARTE, C.G., F. CHOMETY, G. GIEBISCH : Effect of amiloride, ouabain and furosemide on distal tubular function in the rat. Amer. J. Physiol. 221, 632 (1971)

8. EDELMAN, J.S. : Subcellular distribution and mode of action of aldosterone. In: Steroid Dynamics, edited by G. Pincus, T. Nakao and J.F. Tait, p. 551, N.Y., London: Academic Press, 1966

9. EDELMAN, J.S. : Action of aldosterone on sodium transport. Abstract. International Congress of Nephrology, Washington D.C., Sept. 25-30, p. 67, 1966

10. EDMONDS, C.J., J. MARRIOTT : Factors influencing the electrical potential across the mucosa of rat colon. J. Physiol. 194, 457 (1968)

11. EDMONDS, C.J., J. MARRIOTT : The effect of aldosterone and adrenalectomy on the electrical potential difference of rat colon and on the transport of sodium, potassium, chloride and bicarbonate. J. Endocr. 39, 517 (1967)

11a. EDMONDS, C.J. : Transport of sodium and secretion of potassium and bicarbonate by the colon of normal and sodium-depleted rats. J. Physiol. 193, 596 (1967)

12. EDMONDS, C.J. : Electrical potentials of the sigmoid colon and rectum in irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. Gut 11, 867 (1970)

13. EIGLER, J., J. KELTER, E. RENNER : Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidin Amilorid HCl (MK 870) an der isolierten Haut von Amphibien. Klin. Wschr. 14, 737 (1967)

14. FORTH, W., W. RUMMEL, J. BALDAUF : Wasser- und Elektrolyt-bewegung am Dünn- und Dickdarm unter dem Einfluß von Laxantien, ein Beitrag zur Klärung ihres Wirkungsmechanismus. Naunyn-Schmiedebergs Archiv Pharmak. u. exp. Path. 254, 18 (1968)

15. HIERHOLZER, K., M. WIEDERHOLT, H. STOLTE : Hemmung der Natrium-resorption im proximalen und distalen Konvolut adrenalekto-mierter Ratten. Pflügers Archiv 291, 43-62 (1966)

16. LEVITAN, R., F.J. INGELFINGER : Effect of d-aldosterone on salt and water absorption from the intact human colon. J. clin. Invest. 44, 801 (1965)

17. OVERHOFF, H., W. FORTH, F. NELL, K. PFLEGER, W. RUMMEL : Zur Klärung der Ursachen des durch Oxyphenisatin bedingten Netto-Transfers von Wasser und Natrium am Colon der Ratte. Arch. Pharm. 266, 419 (1970)

18. PARSON, D.S., G. POVIS : Some properties of a preparation of rat colon perfused in vitro through the vascular bed. J. Physiol. 217, 641 (1971)

19. PHILLIPS, S.F., P.F. SCHMALZ : Bicarbonate secretion by the rat colon effect of intraluminal chloride and acetazolamide. Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 135, 116 (1970)

20. RUMMEL, W. : Enterale Resorptionsvorgänge und ihre Beeinflussung. Naunyn-Schmiedebergs Archiv Pharmak. 250, 189 (1965)

21. SHARP, G.W.G., A. LEAF : The mechanism of action of aldosterone. Physiol. Rev. 46, 593 (1966)

22. SITTE, H. : Beziehung zwischen Zellstruktur und Stofftransport in der Niere. "2. Internationales Symposium der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte" : Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle. Weimar 1964

23. STOLTE, H., J.P. BRECHT, M. WIEDERHOLT, K. HIERHOLZER : Einfluß von Adrenalektomie und Glucocorticoiden auf die Wasserpermeabilität corticaler Nephronabschnitte der Rattenniere. Pflügers Archiv 299, 99-127 (1968)

24. VOGEL, G., E. MEYERING, J. STOECKERT : Gleichgewichtskonzentrationen einiger Plasma-Solute und Na^+ -Absorption bei Erhöhung des Na^+ -Angebotes durch Steigerung der Na^+ -Angebotskonzentration oder des Perfusionsvolumens/Zeit im Jejunum und Colon von Ratten. Pflügers Archiv 310, 150-166 (1969)

25. WIEDERHOLT, M., H. STOLTE, J.P. BRECHT, K. HIERHOLZER : Mikropunktionsuntersuchungen über den Einfluß von Aldosteron, Cortison und Dexamethason auf die renale Natriumresorption adrenalektomierter Ratten. Pflügers Archiv 292, 316-333 (1966)

26. LANGE, S., C. VEIT, U. HEGEL, U. GUTSCHE : Die Wirkung von Amilorid auf den Elektrolyttransport des Rattencolon und ihre Abhängigkeit von Mineralocorticoiden. Endokrinologie, Band 63, Heft 2, 1974, S. 271-278 (J.A. Barth, Leipzig)

Curriculum vitae

Am 21. August 1947 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. med. Reinhard Veit und seiner Frau Elly in Wuppertal geboren. Nach Beendigung der vierjährigen Volksschulzeit im Jahr 1958 besuchte ich das neusprachlich-naturwissenschaftliche Carl-Humann-Gymnasium in Essen-Steele. Dort bestand ich im Juli 1967 das Abitur. Mit Beginn des Wintersemesters 1967/68 konnte ich mich an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz für das Studienfach Humanmedizin immatrikulieren. Nach sechs vorklinischen Semestern an dieser Universität setzte ich ab dem Wintersemester 1970/71 mein Studium an der Freien Universität Berlin fort und beendete dieses im März 1974 nach sechs klinischen Semestern mit der Ärztlichen Prüfung erfolgreich. Anschließend begann ich meine Medizinalassistenten-Zeit im Fach Innere Medizin. Daran schlossen sich vier Monate in der Chirurgie an. Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent in der Gynäkologie tätig.